

Referendo 21

=> S JP2001281222/PN

L2 1 JP2001281222/PN

=> D MAX

L2 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX COPYRIGHT 2005 THE THOMSON CORP on STN

AN 2001-616409 [71] WPINDEX

DNN N2001-459781 DNC C2001-184568

TI Detecting bioorganic molecules comprises concentrating the bioorganic molecules on an adsorbent surface and detecting the molecules on the probe by gas phase ion spectrometry.

DC B04 S03

IN PHAM, T T

PA (CIPH-N) CIPHERGEN BIOSYSTEMS INC

CYC 94

PI WO 2001071326 A2 20010927 (200171)\* EN 31 G01N027-00

RW: AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ  
NL OA PT SD SE SL SZ TR TZ UG ZW

W: AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CR CU CZ DE DK DM  
DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC  
LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE  
SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW

JP 2001281222 A 20011010 (200175) 12 G01N027-62 <—

AU 2001047620 A 20011003 (200210) G01N027-00

US 2002060290 A1 20020523 (200239) H01J049-04

ADT WO 2001071326 A2 WO 2001-US8944 20010319; JP 2001281222 A JP 2000-107220  
20000407; AU 2001047620 A AU 2001-47620 20010319; US 2002060290 A1  
Provisional US 2000-190764P 20000320, US 2001-812307 20010319

FDT AU 2001047620 A Based on WO 2001071326

PRAI US 2000-190764P 20000320; US 2001-812307 20010319

IC ICM G01N027-00; G01N027-62; H01J049-04

ICS G01N001-00; G01N027-64; G01N030-00; G01N030-72

AB WO 200171326 A UPAB: 20011203

NOVELTY - Detecting bioorganic molecules in a sample is new.

DETAILED DESCRIPTION - Detecting bioorganic molecules in a sample comprises applying the sample to an adsorbent surface of a probe, concentrating the bioorganic molecules on the adsorbent surface and detecting the bioorganic molecules on the probe by gas phase ion spectrometry.

USE - The method is useful for detecting bioorganic molecules in a sample.

Dwg. 0/0

TECH WO 200171326 A2UPTX: 20011203

TECHNOLOGY FOCUS - ORGANIC CHEMISTRY - Preferred Method: The gas phase ion spectrometry method is preferably laser desorption/ionization mass

spectrometry. The sample may be saliva, blood, urine, lymphatic fluid, prostatic or seminal fluid, milk, a cell extract or a cell culture medium. The adsorbent is preferably silicon oxide and the molecules are preferably concentrated by evaporation. An energy absorbing material (cinnamic acid, sinapinic acid or dihydroxybenzoic acid) may be applied after concentrating. The sample may be pre-fractionated by size exclusion or ion exchange chromatography.

KW [1] 1580-0-0-0 CL; 105491-0-0-0 CL; 9891-0-0-0 CL; 107016-0-0-0 CL;  
97055-0-0-0 CL DET

FS CPI EPI

FA AB; DCN

MC CPI: B04-B04B1; B04-B04D5; B04-B04G; B04-B04H; B04-B04K; B04-F01;  
B04-F03; B04-L03B; B05-B02C; B10-C03; B10-C04E; B11-C08A; B12-K04E  
EPI: S03-E02

DRN 1416-U; 1694-U

CMC UPB 20011203

M1 \*05\* M423 M424 M740 M750 M905 N102  
DCN: RA02YE-K; RA02YE-A

M2 \*01\* G010 G100 H7 H721 J0 J011 J1 J171 M280 M312 M321 M332 M342  
M372 M391 M414 M424 M430 M510 M520 M531 M540 M740 M782 M904 M905  
M910 N102 P831 Q505  
DCN: R01416-K; R01416-D; R01416-M

M2 \*02\* G014 G100 H4 H402 H442 H8 J0 J011 J1 J131 M280 M320 M414  
M424 M430 M510 M520 M531 M540 M740 M782 M904 M905 N102 P831 Q505  
DCN: R08198-K; R08198-D; R08198-M

M2 \*03\* G016 G100 H4 H402 H442 H8 J0 J011 J1 J131 M280 M320 M414  
M424 M430 M510 M520 M531 M540 M740 M782 M904 M905 N102 P831 Q505  
DCN: R18001-K; R18001-D; R18001-M

M2 \*04\* B114 B702 B720 B831 C108 C800 C802 C803 C804 C805 C807 M411 M424  
M430 M740 M782 M904 M905 N102 P831 Q505  
DCN: R01694-K; R01694-D; R01694-M

M6 \*06\* M905 P831 Q505 R514 R528 R611 R612 R613 R614 R632

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2001-281222  
(P2001-281222A)

(43)公開日 平成13年10月10日 (2001. 10. 10)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 27/62		G 0 1 N 27/62	X
1/00	1 0 1	1/00	1 0 1 H
27/64		27/64	B
30/00		30/00	C
30/72		30/72	G

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 12 頁)

(21)出願番号 特願2000-107220(P2000-107220)

(22)出願日 平成12年4月7日(2000. 4. 7)

(31)優先権主張番号 60/190, 764

(32)優先日 平成12年3月20日(2000. 3. 20)

(33)優先権主張国 米国 (US)

(71)出願人 500164570

シファージェン バイオシステムズ, イン  
コーポレイテッド

Ciphergen Biosystem  
s, Inc.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94306,  
パロ アルト, スイート ビー, サ  
ン アントニオ ロード 490

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

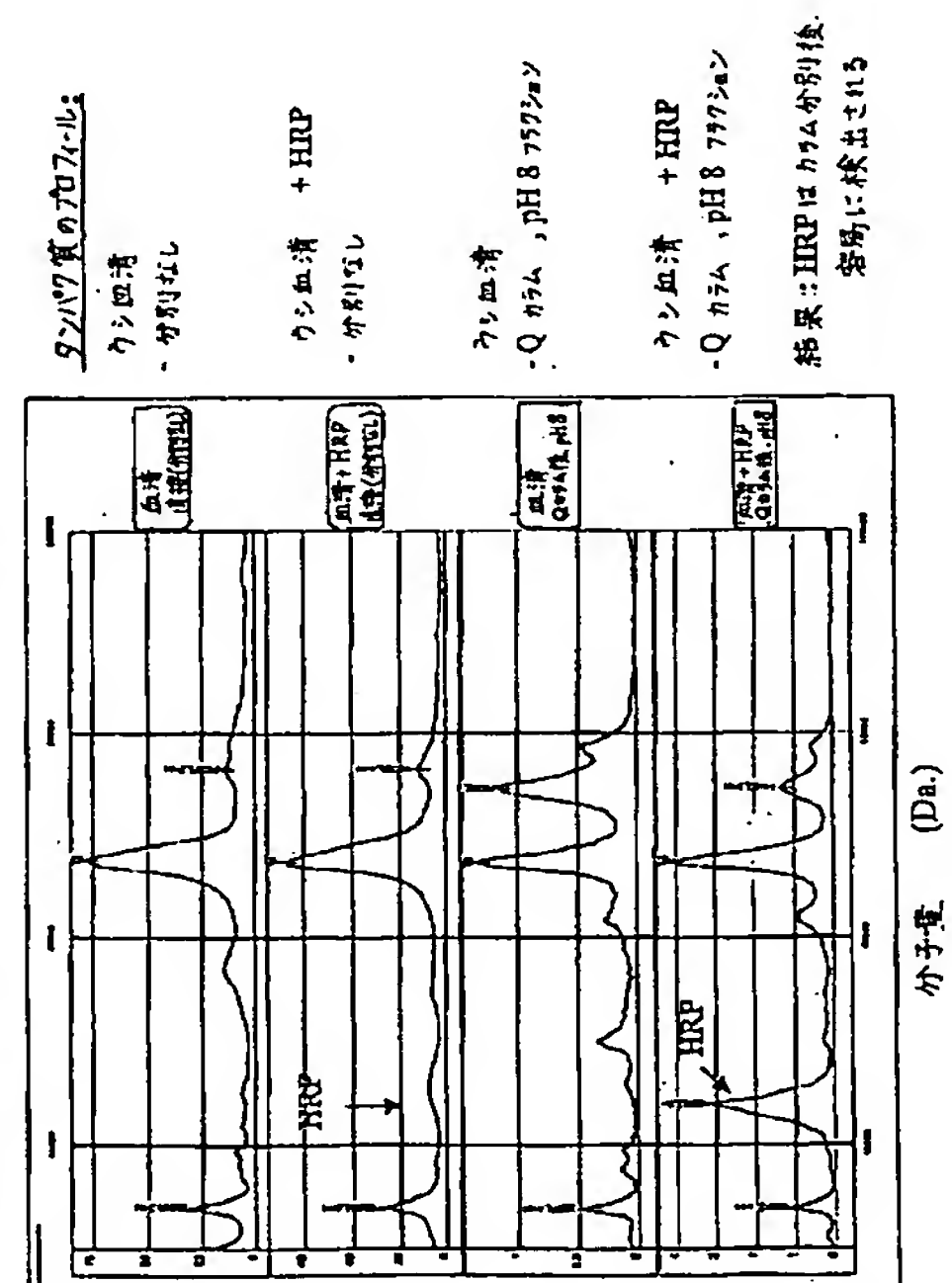
(54)【発明の名称】 質量分析による分析物の分析方法

(57)【要約】

【課題】 試料中の生体分子の分析物を分離するための  
方法を提供すること。

【解決手段】 サンプル中の分析物を気相イオン分光法  
によって分離するための方法であって、この方法は、  
a) 気相イオン分光計のためのプローブを提供する工  
程； b) 吸着剤をサンプルと接触させ、分析物の吸着剤  
への特定のおよび非特定の結合の両方を可能にする工  
程； c) プローブを受容するためのポート；プローブ表  
面上で分析物を脱着およびイオン化するためにエネルギ  
ーを表面に向けるためのエネルギー源；および脱着さ  
れ、イオン化された、プローブ表面と連絡した分析物を  
検出するための手段、を含む気相分光計を提供する工  
程； d) 吸着剤に結合された分析物を、気相イオン分光  
計を用いて、分析物をエネルギー源で脱着およびイオン  
化し、そして脱着され、イオン化された分析物を検出器  
を用いて検出することによって、分離する工程、を包含  
する。

SELDI-Assisted™ タンパク質分離およびプロファイリング  
HRPの検出(血清に添加)は、K30およびQカラムカラム後のみ可能である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 サンプル中の分析物を気相イオン分光法によって分離するための方法であって、以下：

- a) 気相イオン分光計のためのプローブを提供する工程であって、ここで該プローブは表面を有する基板を含み、ここで該表面はそこに結合された吸着剤を有する、工程；
- b) 該吸着剤を該サンプルと接触させ、該分析物の該吸着剤への特定のおよび非特定の結合の両方を可能にする工程；
- c) 該プローブを受容するためのポート；該プローブ表面上で分析物を脱着およびイオン化するためにエネルギーを該表面に向けるためのエネルギー源；および該脱着され、イオン化された、該プローブ表面と連絡した分析物を検出するための手段、を含む気相分光計を提供する工程；
- d) 該吸着剤に結合された該分析物を、該気相イオン分光計を用いて、該分析物を該エネルギー源で脱着およびイオン化し、そして該脱着され、イオン化された分析物を該検出器を用いて検出することによって、分離する工程を包含する方法。

【請求項 2】 前記気相イオン分光計が、レーザー脱着／イオン化質量分光計である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記分析物の吸収後に、エネルギー吸収物質を前記プローブに適用する工程をさらに包含する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 前記プローブが親水性吸着剤を含有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】 前記親水性吸着剤が酸化ケイ素を含有する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】 前記サンプルが、サイズ排除クロマトグラフィーおよび／またはイオン交換クロマトグラフィーによって、前記吸着剤と接触する前にあらかじめ分別される、請求項 1 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、質量分析を用いた分析物の分析方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】質量分析は、タンパク質の分析法として益々普及している。その普及は、気化（例えば、脱着）およびイオン化の工程ならびに複雑な試料混合物中のタンパク質の分離を改善する工程中のタンパク質のフラグメンテーションを防止する方法の開発により増加している。そのような方法は、例えば、米国特許第 5, 118, 937 号（Hillenkampら）、同第 5, 617, 060 号（Hutchens および Yip）および WO 98/59360（Hutchens および Yip）に記載されている。

【0003】質量分析によるタンパク質の改良された分

析法が必要である。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、試料中の生体分子（bimolecular）の分析物を分離するための方法を提供する。この方法は、a) 気相イオン分光計のためのプローブを提供する工程（このプローブは、表面を有する基板および表面に結合した吸着剤を含有する）；b) 試料を吸着剤に接触させ、（例えば、非結合の分析物を除去することなく試料を乾燥させることにより）吸着剤に特定のおよび非特定の双方の吸着をさせる工程；ならびに c) 試料中の分析物を表面から脱着およびイオン化する工程、ならびに脱着、イオン化された分析物を気相イオン分光計で検出する工程を包含する。こうして試料は、脱着工程において活発な役割を果たし、単に一つの段階としては機能しない表面と接触される。吸着された分析物は、次いで脱着を促進するエネルギー吸着分子に覆われ得る。しかしながら試料は、伝統的な MALDI の場合のように、プローブに導入される前にエネルギー吸着物質と混合されない。特定の実施態様では、気相イオン分光計は、質量分析計、さらに詳細にはレーザー脱着／イオン化質量分析計である。吸着剤は、好ましくはシリコンオキシドを含有する親水性の吸着剤である。他の実施態様では、エネルギー吸収物質が脱着およびイオン化を促進するため乾燥試料に適用される。

【0005】他の実施態様では、試料は、吸着剤と接触される前に分別される。例えば、試料はサイズ分別される。サイズ分別は、例えばサイズ排除クロマトグラフィーで実施され得る。試料はまた、導入される前にアフィニティクロマトグラフィーにより分別される。例えば、クロマトグラフィーは、アニオン交換、カチオン交換またはアフィニティクロマトグラフィーであり得る。これらの方法は、試料の複雑さを減らし、分析物の分離を改善する。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、サンプル中の分析物を気相イオン分光法によって分離するための方法であって、以下：

- a) 気相イオン分光計のためのプローブを提供する工程であって、ここでプローブは表面を有する基板を含み、ここで表面はそこに結合された吸着剤を有する、工程；
- b) 吸着剤をサンプルと接触させ、分析物の吸着剤への特定のおよび非特定の結合の両方を可能にする工程；
- c) プローブを受容するためのポート；プローブ表面上で分析物を脱着およびイオン化するためにエネルギーを表面に向けるためのエネルギー源；および脱着され、イオン化された、プローブ表面と連絡した分析物を検出するための手段、を含む気相分光計を提供する工程；
- d) 吸着剤に結合された分析物を、気相イオン分光計を用いて、分析物をエネルギー源で脱着およびイオン化



し、そして脱着され、イオン化された分析物を検出器を用いて検出することによって、分離する工程を包含することを特徴とし、そのことにより、上記目的が達成される。

【0007】本発明の一つの局面では、気相イオン分光計が、レーザー脱着／イオン化質量分光計である。

【0008】本発明の一つの局面では、分析物の吸収後に、エネルギー吸収物質をプローブに適用する工程をさらに包含する。

【0009】本発明の一つの局面では、プローブが親水性吸着剤を含有する。

【0010】本発明の一つの局面では、親水性吸着剤が酸化ケイ素を含有する。

【0011】本発明の一つの局面では、サンプルが、サイズ排除クロマトグラフィーおよび／またはイオン交換クロマトグラフィーによって、吸着剤と接触する前にあらかじめ分別される。

【0012】

【発明の実施の形態】（1. 定義）他で定義しない限り、本明細書中で使用される全ての技術的および科学的な用語は、本発明が属する分野の当業者により通常理解される意味を有する。以下の参考文献は、本発明で 사용되는多くの用語の一般的な定義を当業者に提供する： Singletonら、Dictionary of Microbiology and Molecular Biology（第2版、1994）；The Cambridge Dictionary of Science and Technology（Walker編、1988）；The Glossary of Genetics（第5版、R. Riegerら編）、Springer Verlag（1991）；およびHale&Marham、The Harper Collins Dictionary of Biology（1991）。本明細書で 사용되는ように、他で特定しない限り以下の用語はこれらに基づく意味を有する。

【0013】「プローブ」とは、気相分析計に取り外しできる形で装着可能な装置のことを言い、分析物の検出のために提供される表面を有する基板を含有する。プローブは、単一の基板または複数の基板を含み得る。ProteinChip™、ProteinChip™ アレイまたはチップのような用語もまた、特定の種類のプローブを意味するために本明細書中で使用される。

【0014】「基板」または「プローブ基板」とは、吸着剤が（例えば、付着、堆積などにより）その上に提供され得る固相のことを言う。

【0015】「表面」とは、本体または基板の外表面または上部境界のことを言う。

【0016】「ストリップ」とは、実質的に平坦または平面状である材料の細長い断片のことを言う。

【0017】「プレート」とは、実質的に平坦または平面状である材料の薄片のことを言い、任意の適切な形状（例えば、長方形、正方形、楕円形、円形など）であり得る。

【0018】「実質的に平坦」とは、本質的に平行であり、小さい表面（例えば、ストリップまたはプレート）よりは明らかに大きい、大きな表面を有する基板のことを言う。

【0019】「吸着剤」とは、分析物を吸着し得る任意の物質のことを言う。「吸着剤」という用語は、本明細書で、分析物が曝露される単一の物質（「モノプレックス吸着剤」）（例えば、化合物または官能基）、および分析物が曝露される複数の異なった物質（「マルチプレックス吸着剤」）の両方のことを言うために使用される。マルチプレックス吸着剤中の吸着剤物質は、「吸着剤種」として言及される。例えば、プローブ基板上的アドレス可能な位置は、異なった結合特性を有する多くの異なった吸着剤種（例えば、アニオン交換物質、金属キレート剤または抗体）により特徴づけられるマルチプレックス吸着剤を含み得る。基板物質それ自体は、また分析物の吸着に寄与し得、「吸着剤」の一部とみなされ得る。

【0020】「吸着」または「保持」とは、溶離液（選択性閾値調節剤）または洗浄液で洗浄される以前または以後のいずれかに、吸着剤と分析物の間に検出され得る結合のことを言う。

【0021】「溶離液」または「洗浄液」とは、分析物の吸着剤への吸着を仲介するため使用できる薬剤のことを言う。溶離液および洗浄液はまた、「選択性閾値調節剤」としても言及される。溶離液および洗浄液は、プローブ基板表面から非結合物質を洗浄し、除去するため使用できる。

【0022】「特定の結合」とは、吸着剤の特定の分析物に対する引力の基準により主として介在される結合のことを言う。例えば、アニオン交換吸着剤の分析物に対する引力の基準は、陽電荷と陰電荷の間の静電的な引力である。それゆえ、アニオン交換吸着剤は、陰性電荷種との特定の結合に携わる。親水性吸着剤の分析物に対する引力の基準は、水素結合である。それゆえ、親水性吸着剤は、電気的に極性種などとの特定の結合に携わる。

【0023】「分離する」、「分離」または「分析物の分離」とは、試料中の少なくとも1つの分析物を検出することを含む。分離は、試料中の複数の分析物を、分別しそれに続いて区別して検出することにより、検出および区別することを含む。分離は、混合物中の他の全ての分析物から分析物を完全に分別することを必要としない。むしろ、少なくとも2つの分析物の間を区別する任意の分別で十分である。

【0024】「気相イオン分光計」とは、試料が気化されそしてイオン化されたときに、生成したイオンの質量

一電荷比に変換され得るパラメーターを測定する装置のことを言う。一般に、目的のイオンは単一の電荷を帯び、質量一電荷比はしばしば単に質量として言及される。気相イオン分光計は、例えば質量分析計、イオン移動性分析計、および全イオン電流を測定する装置を含む。

【0025】「質量分析計」とは、注入口システム、イオン化源、イオン光学アセンブリ、質量分析器および検出器を包含する気相イオン分光計のことを言う。

【0026】「レーザー脱着質量分析計」とは、分析物を脱着し、気化し、そしてイオン化する手段としてレーザーを使用する質量分析計のことを言う。

【0027】「検出する」とは、検出される対象の存在、非存在または量を同定することを言う。

【0028】「生物学的物質」とは、生物、器官、組織、細胞またはウイルスに由来する任意の物質のことを言う。これは、唾液、血液、尿、リンパ液、前立腺液または精液、乳液などのような生物学的な液体、ならびにこれらの任意の抽出物（例えば、細胞抽出物、細胞培養培地、分別試料など）を含む。

【0029】「生体有機分子」とは、典型的には生体により作られる有機分子のことを言う。これは、例えばヌクレオチド、アミノ酸、糖、脂肪酸、ステロイド、核酸、ポリペプチド、炭水化物、脂質、これらの組み合わせ（例えば、糖タンパク質、リボ核タンパク質、リポタンパク質）を含有する分子を含む。

【0030】「エネルギー吸収分子」または「EAM」とは、質量分析計中でエネルギー源からエネルギーを吸収し、それによってプローブ表面から分析物の脱着を可能とする分子のことを言う。MALDIにおいて使用されるエネルギー吸収分子は、しばしば「マトリックス」として言及される。ケイ皮酸誘導体、シナピン酸およびジヒドロキシ安息香酸は、生体有機分子のレーザー脱着におけるエネルギー吸収分子として頻繁に使用される。エネルギー吸収分子のさらなる記載として米国特許第 5,719,060 号 (Hutchens & Yip) を参照せよ。

【0031】(11. バイオクロマトグラフィー表面を有するプローブ) 本発明の方法は、気相イオン分光計のため取り付けられるプローブに実施される。プローブは、表面を有し、そして表面に付着された基板、分析物を選択的に結合できる吸着剤を包含する。

【0032】(A. 基板) 本発明のプローブは、気相イオン分光計に取り外しできる形で装着可能である。例えば、基板は、その表面に吸着剤を有するストリップの形状であり得る。プローブは、気相イオン分光計に取り外しできる形で装着可能である限り、任意の形状であり得る。これは、例えば長方形または円形のプローブを含み得る。

【0033】プローブはまた、注入口システムおよび気

相イオン分光計の検出器での使用に適合され得る。例えば、プローブは、水平方向、垂直方向および／または回転方向に移動可能な台架にマウントするように適合され得、この台架は手によるプローブの再配置を必要とすることなく連続する位置にプローブを移動する。

【0034】プローブ基板は、好ましくは吸着剤を支持できる物質から作られる。例えば、プローブ基板物質は、絶縁物質（例えば、ガラス、セラミック）、半絶縁物質（例えば、シリコンウェハ）もしくは導電性物質（例えば、ニッケル、黄銅、鋼、アルミニウム、金または導電性ポリマー）、有機ポリマーまたはこれらの組み合わせを含み得るが、これらに限定されない。

【0035】プローブ基板表面は、分析物を結合する状態であり得る。例えば、ひとつの実施態様では、プローブ基板の表面は、吸着剤を表面に配置するための（例えば、化学的、または荒面仕上のような機械的な）状態であり得る。吸着剤は、分析物と結合するための官能基を含む。いくつかの実施態様では、基板物質はそれ自体、また吸着剤の特性に寄与し得、そして「吸着剤」の一部としてみなされ得る。

【0036】吸着剤は、連続または非連続パターンでプローブ基板に配置され得る。連続的な場合、一種以上の吸着剤が基板表面上に配置され得る。複数型の吸着剤が使用される場合、基板表面は、一種以上の結合特性が 1 または 2 次元勾配で変化するようにコートされ得る。非連続の場合、複数の吸着剤が基板表面上の所定のアドレス可能な位置（例えば、質量分析計のレーザービームによりアドレス可能）に配置され得る。アドレス可能な位置は、任意のパターンで配列され得るが、直線、直交配列、または規則的なカーブ（例えば、円）のような規則的なパターンであることが好ましい。各アドレス可能な位置は、同一または異なった吸着剤を含み得る。図 1 では、非連続的なスポットの吸着剤を含むプローブが示される。スポットは、質量分析の間に、レーザーのようなエネルギー源が向けられる際に「アドレス可能」であり、または分析物を脱着するためにスポットを「アドレス」する。

【0037】プローブは、基板物質および／または吸着剤の選択に依存して任意の適切な方法を使用して製造し得る。例えば、金属基板の表面は、金属表面の誘導体化 (derivitization) を許容する物質でコートし得る。さらに詳細には、金属表面は、シリコンオキシド、酸化チタンまたは金でコートし得る。次いで、表面は、二官能基性のリンカーで誘導化され得、その一端は表面に官能基で共有結合され得、そしてそのもう片方の一端は吸着剤として機能する基でさらに誘導化され得る。他の実施例では、結晶性シリコンから産生される多孔性シリコン表面が分析物を結合するための吸着剤を含むため化学的に修飾され得る。さらに他の実施例では、例えば、置換アクリルアミドモノマー、置換アクリ

レートモノマー、または吸着剤として選択した官能基を含むそれらの誘導体を含むモノマー溶液をインサイチュで重合することにより、ヒドロゲル骨格を有する吸着剤が基板表面に直接形成し得る。

【0038】本発明に使用される適切なプローブはまた、例えば米国特許第5,617,060号(HutchensおよびYip)およびWO98/59360(HutchensおよびYip)に記載される。

【0039】(B. 吸着剤) 吸着剤は、分析物を結合する物質である。これらは、プローブを形成する基板の表面に付着される。複数の吸着剤が本発明の方法で使用され得る。異なる吸着剤は、大きく異なった結合特性、幾分異なった異なった結合特性、または微妙に異なった結合特性を示し得る。

【0040】大きく異なった結合特性を示す吸着剤は、典型的には、引力の基準または相互作用の様式が異なる。引力の基準は、一般に化学的または生物学的な分子認識の機能である。吸着剤と分析物の間の引力の基準は、例えば(1)塩促進相互作用、例えば、疎水的相互作用、硫黄好性相互作用、および固定化色素相互作用；(2)水素結合および/またはファンデルワールス力相互作用、および電荷移動相互作用(例えば、親水性相互作用の場合のような)；(3)静電的相互作用(例えば、イオン電荷相互作用、特に陽性または陰性イオン電荷相互作用；(4)吸着剤の金属イオンと配位共有結合(すなわち、配位錯体形成)を形成する分析物の能力；または2つ以上の前記様式の相互作用の組み合わせを含む。すなわち、吸着剤は2つ以上の引力の基準を示すことができ、従って「混合官能基性」吸着剤として公知である。

【0041】(1. 塩促進相互作用吸着剤) 塩促進相互作用を観察するのに有用な吸着剤は、疎水的相互作用吸着剤を含む。

【0042】疎水的相互作用吸着剤の例は、脂肪族炭化水素、特にC1~C18脂肪族炭化水素を有するマトリックス；およびフェニル基のような芳香族炭化水素官能基を有するマトリックスを含む。

【0043】塩促進相互作用を観測するのに有用な別の吸着剤は、硫黄好性相互作用吸着剤(例えば、Pierce, Rockford, Illinoisから市販される硫黄好性吸着剤の一種類であるT-GEL(登録商標)のような)を含む。

【0044】塩促進イオン相互作用および疎水的相互作用もまた含有する第三の吸着剤は、固定化色素相互作用吸着剤を含む。固定化色素相互作用吸着剤は、(例えば、Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jerseyから入手可能なCIBACHRON™ブルーのような)固定化色素のマトリックスを含む。

【0045】(a. 逆相吸着剤-脂肪族炭化水素) ひと

つの有用な逆相吸着剤は、Ciphergen Biosystems, Inc. (Palo Alto, CA) から入手可能な疎水的な(C16)H4チップである。この疎水的なH4チップは、基板表面上の吸着剤としてシリコンオキシド(SiO<sub>2</sub>)の上部に固定化されたC16鎖を含む。

【0046】(2. 親水性相互作用吸着剤) 水素結合および/またはファンデルワールス力を親水性相互作用の基準で観察するのに有用な吸着剤は、シリコンオキシド(例えば、ガラス)のような順相吸着剤を含有する表面を含む。順相またはシリコンオキシド表面は、官能基として作用する。さらに、ポリエチレングリコール、デキストラン、アガロースまたはセルロースのような親水性ポリマーで修飾された表面を含有する吸着剤はまた、親水性相互作用吸着剤として機能し得る。殆どのタンパク質は、水素結合またはファンデルワールス力を含む親水性相互作用を介して結合するアミノ酸残基(すなわち、親水性アミノ酸残基)の基または組み合わせのため、親水性相互作用吸着剤を結合する。

【0047】(a. 順相吸着剤-シリコンオキシド) ひとつの有用な親水性吸着剤は、Ciphergen Biosystems, Inc. (Palo Alto, CA) から入手可能な順相チップである。この順相チップは、基板表面上の吸着剤としてシリコンオキシド(SiO<sub>2</sub>)を含む。シリコンオキシドは、任意の多くの周知方法により表面に適用され得る。これらの方法は、例えば蒸着(例えば、スパッターコーティング)を含む。そのようなプローブの好ましい厚さは、約9000オングストロームである。

【0048】(3. 静電的相互作用吸着剤) 静電的またはイオン電荷相互作用を観測するために有用である吸着剤は、例えば、硫酸アニオンのマトリックス(すなわち、SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)およびカルボキシレートアニオンマトリックス(すなわち、COO<sup>-</sup>)またはホスフェートアニオン(OPO<sub>3</sub><sup>-</sup>)のようなアニオン性吸着剤を含む。硫酸アニオンを有するマトリックスは、永続的に負に荷電される。しかしながら、カルボキシレートアニオンを有するマトリックスは、そのpKaより大きいpHでのみ負電荷を有する。このpKa未満のpHでは、このマトリックスは、実質的に中性電荷を示す。適切なアニオン性吸着剤はまた、硫酸アニオンおよびカルボキシレートアニオンおよびホスフェートアニオンの組み合わせを有するマトリックスであるアニオン性吸着剤を含む。

【0049】静電的またはイオン電荷相互作用を観測するために有用である他の吸着剤は、カチオン性吸着剤を含む。カチオン性吸着剤の特定の例には、第2級、第3級または第4級アミンのマトリックスが挙げられる。第4級アミンは永続的に正に荷電される。しかしながら、第2級および第3級アミンは、pHに依存する電荷を有する。pKa未満のpHでは、第2級および第3級アミ



ンは正に荷電され、そしてそれらの $pK_a$ より大きい $pH$ では、それらは負に荷電される。適切なカチオン性吸着剤はまた、異なる第2級、第3級、および第4級アミンの組み合わせを有するマトリックスであるカチオン性吸着剤を含む。

【0050】イオン相互作用吸着剤（アニオン性およびカチオン性の両方）の場合において、しばしばアニオンおよびカチオンの両方を含む混合した様式のイオン性吸着剤を使用することが所望され得る。このような吸着剤は、 $pH$ の機能として連続した緩衝能力を提供する。

【0051】また他の吸着剤（これは静電的相互作用を観測するために有用である）には、双極子-双極子相互作用吸着剤が挙げられ、この相互作用は、静電的であるが通常の電荷または滴定可能なタンパク質供与体または受容体は含まれない。

【0052】（a. アニオン性吸着剤）1つの有用な吸着剤は、Palo Alto, CAのCiphergen Biosystems, Inc. によって製造されるSAX1 ProteinChip™のようなアニオン性吸着剤である。SAX1タンパク質チップは $SiO_2$ コーティングアルミニウム基板から製造される。このプロセスにおいて、蒸留水中の第4級アンモニウムポリスチレンミクロスフィア（polystyrenemicrospheres）の懸濁液は、このチップの表面上に堆積される（1mL/スポット、2回）。空気乾燥後（室温、5分）、このチップは、脱イオン水でリンスされ、再び空気乾燥される（室温、5分）。

【0053】（b. カチオン性吸着剤）1つの有用な吸着剤は、Palo Alto, CAのCiphergen Biosystems, Inc. によって製造されるSCX1 ProteinChip™のようなカチオン性吸着剤である。SCX1タンパク質チップは $SiO_2$ コーティングアルミニウム基板から製造される。このプロセスにおいて、蒸留水中のスルホネートポリスチレンミクロスフィアの懸濁液は、このチップの表面上に堆積される（1mL/スポット、2回）。空気乾燥後（室温、5分）、このチップは、脱イオン水でリンスされ、再び空気乾燥される（室温、5分）。

【0054】（4. 配位共有相互作用吸着）金属イオンと配位共有結合を形成する能力を観測するために有用である吸着剤には、例えば、二価および三価金属イオンを有するマトリックスが挙げられる。固定された金属イオンキレート剤のマトリックスは、固定された合成有機分子を提供し、これは1つ以上の電子供与基を有し、この電子供与基は、遷移金属イオンとの配位共有相互作用の基礎を形成する。固定された金属イオンキレート剤として機能する主要な電子供与基には、酸素、窒素、およびイオウが挙げられる。この金属イオンは、固定された金属イオンキレート剤に結合し、その結果、分析物上に電子供与基との相互作用のためのいくつかの残った部分を

有する金属イオン錯体を生じる。適切な金属イオンには、遷移金属イオン（例えば、銅、ニッケル、コバルト、亜鉛、鉄、ならびにアルミニウムおよびカルシウムのような他の金属イオン）が一般的に挙げられる。

【0055】（a. ニッケルキレート吸着剤）別の有用な吸着剤は、IMAC3 (Immobilized Metal Affinity Capture、表面上のニトリロ三酢酸) チップ（これはまたCiphergen Biosystems, Inc. から入手可能）のような金属キレート吸着剤である。このチップは、以下のように製造される：5-メタシルアミド-2-（N, N-ビスカルボキシメタイルアミノ）ペンタン酸（7.5wt%）、アクリロイルトリ-（ヒドロキシメチル）メチルアミン（7.5wt%）およびN, N'-メチレンビスアクリルアミド（0.4wt%）は、光開始剤として-（-）リボフラビン（0.02wt%）を使用して光重合される。モノマー溶液は、粗くエッチングされ、ガラスコーティングされた基板上に堆積され（0.4mL、二回）、そして5分間、近UV露光システム（Hg ショートアークランプ、365nmで20mW/cm<sup>2</sup>）を用いて照射される。この表面は、塩化ナトリウム溶液（1M）で洗浄され、次いで脱イオン水で2回洗浄される。

【0056】Ni(II)を有するIMAC3は、以下のように活性化される。この表面は、 $NiSO_4$ の溶液（50mM、10mL/スポット）で処理され、そして高周波数ミキサーで10分間混合される。 $NiSO_4$ 溶液を除去した後、この処理プロセスが繰り返される。最後に、この表面は、脱イオン水の流れて洗浄される（15秒/チップ）。

【0057】（5. 酵素活性部位相互作用吸着剤）酵素活性部位結合相互作用を観測するために有用である吸着剤には、プロテアーゼ（例えば、トリプシン）、ホスファターゼ、キナーゼおよびヌクレアーゼが挙げられる。この相互作用は、酵素における触媒結合部位を有する分析物（代表的には生体高分子）上の酵素結合部位の配列特異的相互作用である。

【0058】（6. 可逆性共有相互作用吸着剤）可逆性共有相互作用を観測するために有用である吸着剤には、ジスルフィド交換相互作用吸着剤が挙げられる。ジスルフィド交換相互作用吸着剤には、固定されたスルフヒドリル基（例えば、メルカプトエタノールまたは固定されたジチオトレイトール（dithiothreitol））を含む吸着剤が挙げられる。この相互作用は、吸着剤と分析物上の溶媒に曝されたシステイン残基との間の共有ジスルフィド結合の形成に基づく。このような吸着剤は、システイン残基および還元されたイオウ化合物を含むように改変された塩基を含む核酸を有するタンパク質またはペプチドと結合する。

【0059】（7. 糖タンパク質相互作用吸着剤）糖タ



ンパク質相互作用を観測するために有用である吸着剤には、糖タンパク質相互作用吸着剤が挙げられ、例えばこれらの吸着剤はそこに固定されたレクチン（すなわち、オリゴ糖を有するタンパク質）（この例は、CONCO NAVAL INTMである）を有し、これはPharmacia Biotech of Piscataway, New Jerseyから市販されている。このような吸着剤は、巨大分子上の炭水化物部分の分子認識を含む相互作用に基づいて機能する。

【0060】（8. 生体特異的相互作用吸着剤）生体特異的相互作用を観測するために有用である吸着剤は、一般に「生体特異的親和性吸着剤」と呼ばれる。吸着は、それが選択的であり、そして親和性（平衡解離定数、 $K_d$ ）が少なくとも $10^{-3}$  M～（例えば、 $10^{-5}$  M、 $10^{-7}$  M、 $10^{-9}$  M）までである場合、生体特異的であると見なされる。生体特異的親和性吸着剤の例には、特定の生体分子と特異的に相互作用しかつ結合する任意の吸着剤が挙げられる。生体特異的親和性吸着剤には、例えば以下が挙げられる：固定された抗体（これは抗原に結合する）；固定されたDNA（これはDNA結合タンパク質に結合する）、DNA、およびRNA；固定された基質またはインヒビター（これらは、タンパク質および酵素に結合する）；固定された薬剤（これは薬剤結合タンパク質に結合する）；固定されたリガンド（これはレセプターに結合する）；固定されたレセプター（これはリガンドに結合する）；固定されたRNA（これはDNAおよびRNA結合タンパク質に結合する）；固定されたアビジンまたはストレプトアビジン（これらはビオチンおよびビオチン化分子に結合する）；固定されたリン脂質膜およびベシクル（これらは脂質結合タンパク質に結合する）。

【0061】（III. 試料調製）本発明に使用される試料は、任意の生物学的材料源由来であり得る。これには、体液（例えば、血液、血清、唾液、尿、前立腺液、精液など）が挙げられる。それにはまた、生物学的試料（例えば、細胞溶解物、細胞培養培地など）由来の抽出物が挙げられる。好ましくは、この試料は液体形態であり、そして固体材料は除去されている。

【0062】この試料は、プローブ表面の吸着剤に直接適用され得る。あるいは、この試料は、使用前に分別され得る。分別は、試料中の分析物の複雑さを減少するので有用である。この試料は、生体分子を分離するために有用な任意の公知の方法によって分別され得る。分離は、例えば、ゲル排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動および膜透析または超遠心分離によって大きさに基づき得る。HPLCは、有用な方法である。分離はまた、分析物によって保有される電荷に基づき得る（例えば、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー）か、または疎水性（例えば、C1-18樹脂）または親和性法（免疫親和性、固定した金属、DNA、色素）に基づ

き得る。分別の他の方法には、例えば結晶化および沈殿が挙げ得られる。

【0063】別の実施態様において、これらの方法が組み合わされ得る。好ましい実施態様における例では、この試料は、サイズ排除クロマトグラフィー、続いてアニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィーによって分別される。

【0064】この試料は、プローブ基板上の吸着剤と接触される。次いで、この試料は、吸着剤上で乾燥される。この結果、吸着剤に結合されない分析物を洗い流すことなく、この吸着剤によって試料中の分析物の特定のおよび非特定の吸着の両方をもたらす。一般的に、試料の容量（約 $1\mu\text{l}$ から $500\mu\text{l}$ 中で数アットモルから $100$ ピコモルの分析物を含有する）は、この吸着剤に結合するために十分である。

【0065】分析物がプローブに適用されそして乾燥された後、気相イオン分光法を使用して検出される。プローブ上の吸着剤に結合された分析物または他の物質は、気相イオン分光計を使用して分析され得る。この分析物の量および特性は、気相イオン分光法を使用して測定され得る。目的の分析物に加えて他の物質もまた、気相イオン分光法（例えば、レーザー脱着イオン化質量分析法）によって検出され得る。

【0066】（IV. 気相イオン分光法）

（A. 気相イオン分光法検出）好ましい実施態様において、この分析物は、レーザー脱着質量分析法によって検出される。レーザー脱着質量分析法は、レーザーエネルギー源に対してプローブ表面上に分析物を与える工程を包含し、このレーザーエネルギー源は、プローブ表面から分析物を脱着し、そしてそれをイオン化する。次いで、この脱着されそしてイオン化された分析物は検出される。次いで、エネルギー吸収分子（例えば、溶液中）は、分析物またはプローブ基板表面上に結合した他の物質に適用され得る。スプレー、ピペッティングまたはディッピングが使用され得る。

【0067】1つの実施態様において、質量分析計は、プローブ上の分析物を検出するために使用され得る。典型的な質量分析計において、分析物を有するプローブは、質量分析計の入口システムへ導入される。次いで分析物は、脱着源（例えば、レーザー、高速原子衝突、または高エネルギープラズマ）によって脱着される。発生され、脱着され、揮発された種は、予め形成されたイオンまたは中性物からなり、これらは脱着事象の直接の結果としてイオン化される。発生したイオンは、イオン光学アセンブリによって収集され、次いで質量分析器は通過イオンを散乱し、そして分析する。質量分析器を出るイオンは検出器によって検出される。次いで検出器は、質量対電荷比へ検出したイオンの情報を変換する。分析物または他の物質の存在の検出は、典型的には、シグナル強度の検出を包含する。次に、このことは、プローブ

に結合する分析物の量および特性を反映し得る。

【0068】好ましい実施態様において、レーザー脱着飛行時間質量分析計は本発明のプローブと共に使用される。レーザー脱着質量分析法において、結合した分析物を有するプローブは、入口システムへ導入される。この分析物は脱着され、そしてイオン化源からレーザーによって気相へイオン化される。この発生したイオンは、イオン光学アセンブリによって収集され、次いで飛行時間質量分析器において、イオンが短い高電場を介して加速され、そして高真空チャンバへ押し流される。高真空チャンバの離れた端部にて、この加速されたイオンは異なる時間で高感度検出で表面にぶつかる。飛行時間はイオンの質量の関数であるので、イオン形成とイオン検出器衝突との間の経過した時間は、特定の質量電荷比の分子の存在または非存在を同定するために使用され得る。当業者が理解するように、レーザー脱着飛行時間質量分析計の任意のこれらの構成要素は、質量分析計のアセンブリにおいて本明細書中で記載される他の構成要素と組み合わせられ得、この質量分析計は、脱着、加速、検出、時間の測定などの種々の手段を使用する。

【0069】典型的なレーザー脱着質量分析計は、337.1nmにて窒素レーザーを使用し得る。有用なパルス幅は、4ナノ秒である。一般的に、約1~25μJの出力が使用される。

【0070】別の実施態様において、イオン移動度分析計は、分析物を検出および特徴づけするために使用され得る。イオン移動度分析法の原理は、イオンの異なる移動度に基づいている。具体的には、イオン化によって生成された試料のイオンは、電場の影響下で気体を含むチューブを通して、異なる速度（その差異（例えば、質量、電荷、または形状）に起因して）で移動する。このイオン（典型的には電流の形態で）は、検出器で登録され、次いで、これらは試料の分析物または他の物質を同定するために使用され得る。イオン移動度分析法の1つの利点は、大気圧で操作し得ることである。

【0071】また別の実施態様において、全イオン電流測定装置が、分析物を検出および特徴づけするために使用され得る。この装置は、プローブが単一型の分析物のみを結合する表面化学物質を有する場合に使用され得る。単一型の分析物がプローブに結合する場合、イオン化した分析物から発生した全電流は、分析物の性質を反映する。次いで、分析物によって生成された全イオン電流は、公知の化合物の保存された全イオン電流と比較され得る。次いで、この分析物の特徴が決定され得る。

【0072】(B. データ分析) 分析物の脱着および検出から生じるデータを、プログラム可能なデジタルコンピュータを用いて分析し得る。このコンピュータプログラムは一般に、コードを保存する読み取り可能な媒体を含む。プローブ上の各々の性質の配置、その性質における吸着剤の同一質、およびその吸着剤を洗浄するのに用

いる溶離条件を含むメモリに対して、一定のコードが与えられ得る。この情報を用いて、このプログラムは次いで、一定の選択性の特性（例えば、使用する吸着剤および溶離液 (eluant) のタイプ) を規定するプローブ上の性質のセットを同定し得る。このコンピュータはまた、入力として受容するコード、プローブ上の特定のアドレス可能な位置から受容した様々な分子量におけるシグナルの強度のデータを含む。このデータは、検出された分析物の数（必要に応じて、検出された各々の分析物について、シグナル強度および決定された分子量を含む）を示し得る。

【0073】データ分析は、検出された分析物のシグナル強度（例えば、ピークの高さ）を決定する工程、および「外部にあるもの」（所定の統計分布から逸脱したデータ）を除去する工程を包含する。例えば、観察されたピークは規格化され得、プロセスはこれによって何らかの参照に対する各々のピークの高さが計算される。例えば、参照は、器具および化学物質（例えば、エネルギーを吸収する分子）により生じるバックグラウンドノイズであり得、これをそのスケールにおいてはゼロに設定する。次いで、各々の分析物または他の基質について検出されたシグナル強度を、相対強度の形態で、所望のスケール（例えば、100）で表示し得る。あるいは、標準がサンプルとともに収容され得、これによってその標準からのピークを参照として用いて、各々の分析物または他の検出された分析物について観察されたシグナルの相対強度を計算し得る。

【0074】このコンピュータは、結果として得られたデータを、表示用の様々なフォーマットに変換し得る。あるフォーマットにおいては、「スペクトル図またはリテンテート (retentate) マップ」と呼ばれるが、標準的なスペクトル図が表示され得、ここでその図は、各々の特定の分子量において検出器に到達する分析物の量を示す。別のフォーマットにおいては、「ピークマップ」と呼ばれるが、ピーク高さおよび質量の情報のみがスペクトル図から維持され、より鮮明な画像を与え、ほぼ同一の分子量の分析物が、より容易に見られるようにする。さらに別のフォーマットにおいては、「ゲル図」と呼ばれるが、ピーク図からの各々の質量が変換されて各々のピークの高さに基づいたグレースケール画像となり、結果として電気泳動ゲルにおけるバンドと類似の外観となる。さらに別のフォーマットにおいては、「3-Dオーバーレイ」と呼ばれるが、いくつかのスペクトルが重ねられ得、これによって相対的ピーク高さにおける微妙な変化を研究し得る。さらに別のフォーマットにおいては、「差異 (difference) マップ図」と呼ばれるが、2つまたはそれ以上のスペクトルが比較され得、固有の分析物、および試料間で上方、または下方に調節された分析物を、好都合に表示 (highlight) する。任意の2つの試料からの分析物プロ

ファイル（スペクトル）を視覚的に比較し得る。

【0075】（V. 実施例ーウシ血清中のマーカー（西洋ワサビペルオキシダーゼ）の検出）異なった個体の血清試料中のタンパク質を、異なった様式で表現し得る。プロテインチップ技術をタンパク質分別法と共に用いて、これらの試料中で上方に調節または下方に調節したタンパク質を検出する。

【0076】実験には、ウシ血清に低濃度（0.5%全タンパク質未満）においてタンパク質マーカー（西洋ワサビペルオキシダーゼーHRP）を添加したものおよび添加しないものをプロファイリングに用いた。タンパク質分別前のこれら2つの試料のプロファイルと比較して、HRPを検出した。図2の上の2つのトレースを参照のこと。

【0077】これら2つの試料を、K30サイズ選択（これは、15kDより低いタンパク質を30kDより高いものから分離する）スピнкаラムで、次いでQ-アニオン交換体（強いアニオン交換体）スピнкаラムで、分別する。これらのスピнкаラムはいずれも、Ciphaergen Biosystems, Inc. から入手可能である。類似の機能を果たすスピнкаラムは当該分野において周知であり、他の製造元から市販されている。カラムフラクション中のタンパク質をプロファイルして、HRPを検出する。図2の下側の2つのトレースが、この結果を示す。プロトコルは実質的に、以下に述べる通りである。

【0078】（A. K30サイズ選択スピнкаラムによるタンパク質分別）5M NaClおよび1% Tritonストックを用いて、血清または溶解物（約5mg/mlタンパク質またはそれより高い）を、0.4M NaClおよび0.01%（v/v）Triton X-100を有するように調節する。元の試料の約10%希釈が理想的である。よく混合して冷蔵で20分間インキュベートする。

【0079】30μLの試料のアリコート、20mM Tris-HCl中でpH9.0の平衡状態にしたサイズ排除スピнкаラムに適用する。続くプロトコルをサイズ選択スピнкаラムのために追跡する。

【0080】（1. 貯蔵緩衝液交換）

1. スピнкаラムのアウトレットキャップを壊す。このカラムを1.5ml管（2ml管がなお良い）に挿入する。

【0081】2. そのスピнкаラムの頂部キャップを開ける。貯蔵緩衝液を重力によって管内へと流入させる。貯蔵緩衝液が容易に落下しない場合は、硬い面上でカラムおよび管ユニットを数回たたか、または3000rpmで数秒間遠心器にかける。

【0082】3. さらに滴が出て来なくなるまで、貯蔵緩衝液（例えば、PBS）を重力によって排出する。その管を空にする。

【0083】4. 約0.75mlの所望の緩衝液（例えば、20mM Tris-HCl（pH9.0））をそのカラムに適用し、それを重力によってカラムマトリックスを通じて流す。この工程をさらに2回繰り返して、少なくともカラム体積の3倍の新しい緩衝液が通過するようにする。

【0084】（2. タンパク質精製プロトコル）

1. スピнкаラムのアウトレットキャップを壊す。そのカラムを1.5ml管（2ml管がなお良い）に挿入する。そのスピнкаラムの頂部キャップを開ける。

【0085】2. そのスピнкаラムを約700×g（約3000rpm）で3分間、卓上遠心分離器中で遠心分離する。管内に溶出した貯蔵緩衝液がそのカラムの出口端に触れるならば、その管を空にしてこの遠心分離工程をもう1度繰り返す。カラムマトリックスを下方に充填して半乾燥させなければならないが、割るべきではない。

【0086】3. そのスピнкаラムを新しい1.5ml管に移す（または第一の管から貯蔵緩衝液を完全に空にする）。20~30μLのタンパク質試料をその充填したカラムマトリックスの中心にゆっくりと適用し、その試料をそのカラムマトリックスの側部に流してはならない。

【0087】4. 約700×gで3分間遠心分離する。精製したタンパク質を回収管に入れる。

【0088】5. 任意：連続するフラクション中で次第に少なくなるタンパク質を回収するために、上記2工程を、25μLアリコートの緩衝液を適用して繰り返す。

【0089】6. カラムを新たな管に移動し、30μLの20mM Tris-HCl（pH9.0）を適用する。4つのフラクションの合計である30μLを、カラムで平衡化された緩衝液を用いて各試料ごとに回収した。

【0090】（B. Qアニオン交換体スピнкаラムによるタンパク質分別）K30カラムのフラクション1および2を合わせる。20mM Tris-HCl（pH9.0）を用いてその体積を100μLに調節する。よく混合して冷蔵で5分間インキュベートする。

【0091】100μLの試料を、20mM Tris-HCl（pH9.0）中で平衡化された強アニオン交換体スピнкаラム（例えば、Ciphaergen Biosystems, Inc. からの「Q」カラム）に適用する。強アニオン交換体スピнкаラムのために、そのプロトコルを追跡する：

（1. 貯蔵緩衝液交換）

1. スピнкаラムのアウトレットキャップを壊す。そのカラムを1.5ml管（2ml管がなお良い）に挿入する。

【0092】2. そのスピнкаラムの頂部キャップを開く。貯蔵緩衝液をその管に重力によって流入させる。貯



蔵緩衝液が容易には落下しないならば、そのカラムおよび管ユニットを硬い表面上で数回たたか、または 1000 rpm で約 20 秒間、遠心分離する。

【0093】3. さらに滴が出て来なくなるまで、貯蔵緩衝液を重力によって排出させる。その管内の緩衝液を空にする。

【0094】4. 約 0.5 ml の所望の結合緩衝液をそのカラムに適用し、それを重力によってカラムマトリックスを通過させる。この工程をさらに 2 回繰り返して、カラム体積の少なくとも 10 倍の新しい緩衝液がその樹脂を通過するようにする。

【0095】(2. タンパク質分別/精製プロトコル)  
(a. タンパク質試料の精製)

1. タンパク質試料を、アニオン交換体スピンカラムの平衡化に用いたものと同じ緩衝液条件にしなければならない。

【0096】2. 試料が高度の塩または過度に緩衝した pH (結合緩衝液と異なる) を含むならば、その結合緩衝液によって平衡化されたサイズ選択スピンカラム (K-3 または K-30) 上で、これらをまず緩衝液交換しなければならない。

【0097】3. 試料が結合緩衝液と類似の緩衝液条件ならば、次いでそれらの試料を、その結合緩衝液を用いて、10 倍 (10×) に希釈し得る。

【0098】(b. Q アニオン交換体スピンカラム上でのタンパク質分別)

1. スピンカラムの出口キャップを壊す。そのカラムを 1.5 ml 管 (2 ml 管がなお良い) に挿入する。そのスピンカラムの頂部キャップを開く。

【0099】2. そのスピンカラムを 1000 rpm (約 80×g) で 20 秒間~1 分間、卓上遠心分離器で遠心分離する。そのカラムマトリックスを下方に充填して、半乾燥しなければならないが、割るべきではない。

【0100】3. そのスピンカラムを新しい 1.5 ml 管に移す (または、貯蔵緩衝液をその第一の管から完全に空にする)。20~500 µl のタンパク質試料 (結合緩衝液中で調節された) を、その充填されたカラムマトリックスの頂部中心に適用し、数分間、またはさらに滴がカラムから出て来なくなるまで、その試料を重力によってそのアニオン交換樹脂を通過させる。

【0101】4. 1000 rpm で 1 分間遠心分離する。この第一の回収管内に回収されたタンパク質 (フラクション番号 1) はそのカラムに結合しない。なぜなら、この結合緩衝液条件では、これらは中性であるかまたは正の正味の電荷を有するか、あるいはカラムから流出する能力があり得るからである。

【0102】5. 任意: タンパク質のアニオン交換樹脂上への捕獲を最大化するために、溶離液をそのカラムに再び適用して、最後の 2 工程に続き得る。

【0103】6. そのカラムを第二の管に移動する。そ

のカラムを 100 µl の結合緩衝液で洗浄する。1000 rpm で 1 分間遠心分離する。フラクション番号 2 を蓄える。

【0104】7. そのカラムを第三の管に移動する。100~200 µl の溶離緩衝液 A を適用し、約 1 分間放置する。1000 rpm で 1 分間遠心分離する。フラクション番号 3 を蓄える。

【0105】8. そのカラムを第四の管に移動する。100~200 µl の溶離緩衝液 B を適用し、約 1 分間放置する。1000 rpm で 1 分間遠心分離する。フラクション番号 4 を蓄える。

【0106】9. このプロセスを続く溶離緩衝液について続ける。

【0107】10. これらのフラクション中のタンパク質を次いで、SELDI™ PBS 読み取り装置によって、疎水性 H4 または順相のアレイを用いて、プロファイルする。

【0108】溶離緩衝液は典型的に、緩衝液 (例えば、Tris、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム)、緩衝液強度 (例えば、20 mM~50 mM) に従って変化する。有用な緩衝液は、20~50 mM Tris、塩濃度および pH を含む。

【0109】そのカラムを 1000 rpm で 1 分間遠心分離する。同じカラムに流れを再び適用して、タンパク質の結合を最大化する。そのカラムを 1000 rpm で 1 分間、遠心分離する。これは、pH 9 のフラクションである。

【0110】カラムを新しい管に移動し、100 µl の 20 mM Tris-HCl (pH 9.0) をそのカラム樹脂に適用する。そのカラムを 1000 rpm で 1 分間遠心分離する。これは pH 9 洗浄フラクションである。これを pH 9 フラクションと合わせ得る。

【0111】カラムを新しい管に移動し、100 µl の 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) をそのカラム樹脂に適用する。カラム頂部におけるいくつかの圧力を緩衝液がその樹脂を通じてゆっくりと移動するように適用して、室温にて 5 分間インキュベートする。そのカラムを 1000 rpm で 1 分間遠心分離する。これは pH 8 フラクションである。

【0112】他の溶離緩衝液 (より低い pH) について、番号 8 の工程を繰り返す。

【0113】(C. SELDI チップ上のタンパク質) Ciphergen Biosystems, Inc. からの順相チップを、スピンカラムによって生成されたフラクションにおけるタンパク質をプロファイルするために使用した。逆相 H4 疎水性チップ (Ciphergen Biosystems, Inc. より入手可能) を特に、高濃度の NaCl を含有するフラクションのために使用した。

【0114】各フラクションの 1 µl アリコートは順相

チップ上のスポットに堆積され、サンプルを約5分間室温で乾燥させた。さらなる容量の同一サンプルは、同一のスポットに適用され、そして乾燥され得る。H4チップ上に堆積されたサンプルは、乾燥させる前に、5  $\mu$ lの水で2回洗浄されるべきである。

【0115】50%アセトニトリル+0.25%TFA中の0.5  $\mu$ lの飽和シナピン酸(SPA)を各スポットに適用した。チップを室温で5分間乾燥させた。第2のアリコートである、50%アセトニトリル+0.25%TFA溶液中の0.5  $\mu$ l飽和SPAシナピン酸を適用した。

【0116】(D. データ獲得およびタンパク質プロフィール分析)各チップを、Protein Biology System I (PBSI)読み取り器(Ciphergen Biosystems, Inc. から)によって読み取った。

【0117】自動モードを、データ収集(SELDI定量設定)のために使用した。タンパク質プロフィールの2セットを回収する(1つは低レーザー強度であり、そしてもう1つは高レーザー強度である)。

【0118】異なる溶解物からのタンパク質プロフィールを、SELDIソフトウェアを使用して比較した。差異が示されたタンパク質を検出した。

【0119】本発明は、サンプル中の生体分子分析物を分析するための、新規の材料および方法を提供する。特定の例が提供されるが、上記記載は例示であり、限定するものではない。上記の実施態様の任意の1つ以上の特徴は、本発明の任意の他の実施態様の1つ以上の特徴と、任意の様式で組み合わせられ得る。さらに、本発明の多数の改変は、本明細書を読めば当業者に明らかとなる。従って、本発明の範囲は、上記記載を参照して決定されるだけでなく、それらの等価の十分な範囲に沿って添付の特許請求の範囲を参照して決定されるべきである。

【0120】本明細書中で引用されるすべての刊行物および特許書類は、各個々の刊行物または特許書類が個々に示されるようなものと同一の範囲にまで、すべての目的のためにその全体が参考として援用される。本明細書中の種々の参照の引用によって、出願人は、任意の特定の参照を本発明の「先行技術」であることを認めない。

【0121】本発明は、サンプル中の分析物を質量分析によって分析するための方法を提供する。本方法は、サ

イズ排除および/またはイオン交換クロマトグラフィーによってサンプルをあらかじめ分別する工程、質量分析プローブの表面に付着された吸着剤にサンプルを適用する工程、および分析物の吸着剤への特定のおよび非特定の吸着の両方を可能にする工程(例えば、非結合のサンプルを除去するために洗浄することなくサンプルを乾燥させることによって)を包含する。次いで、エネルギー吸収物質は乾燥されたサンプルに加えられ、そしてこのサンプルはレーザー脱着/イオン化質量分析法によって分析される。

【0122】

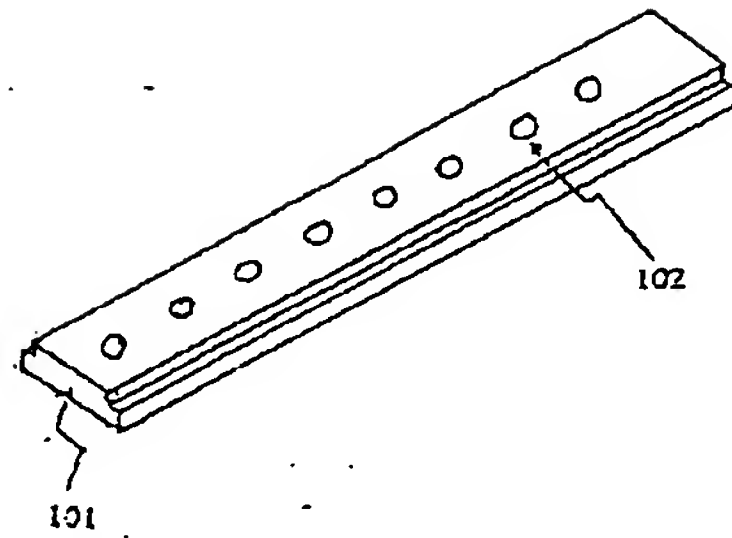
【発明の効果】本発明によって、試料中の生体分子の分析物を分離するための方法が提供される。この方法は、a) 気相イオン分光計のためのプローブを提供する工程(このプローブは、表面を有する基板および表面に結合した吸着剤を含有する); b) 試料を吸着剤に接触させ、(例えば、非結合の分析物を除去することなく試料を乾燥させることにより)吸着剤に特定のおよび非特定の双方の吸着をさせる工程; ならびにc) 試料中の分析物を表面から脱着およびイオン化する工程、ならびに脱着、イオン化された分析物を気相イオン分光計で検出する工程を包含する。本発明による方法を用いると、試料の複雑さが少なくなり、分析物の分離が改善する。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、基板101および吸着剤102の非連続スポットを包含するプローブを示す。プローブは、気相イオン分光計に取り外しできる形で装着可能である。各スポットは、分析物を脱着するためのエネルギー源によりアドレス可能である。

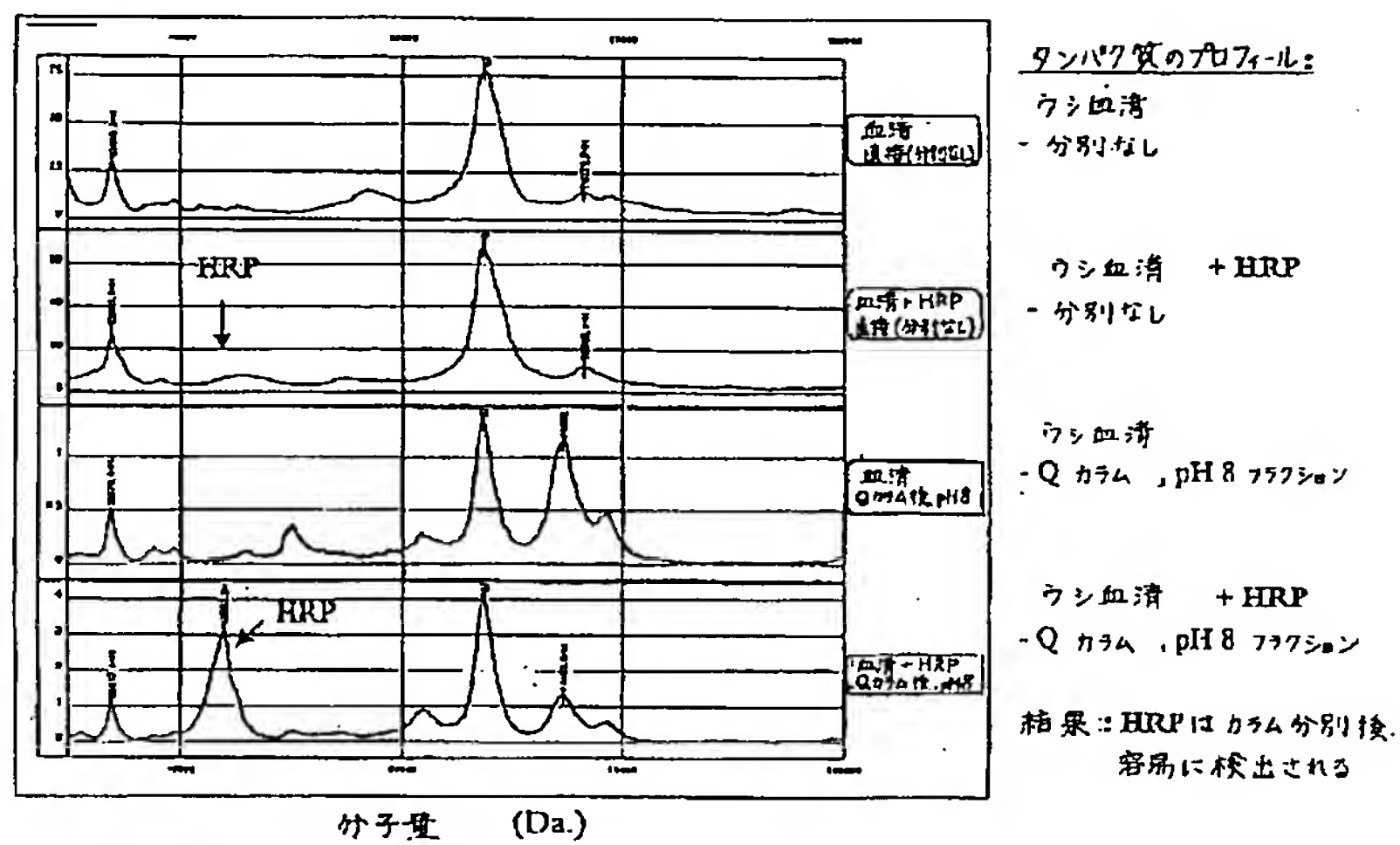
【図2】図2は、本発明の方法によりフラクションおよび検出される以前および以後双方の、2つの試料に存在する異なった微量タンパク質(西洋わさびペルオキシダーゼ)の検出を示す。ウシ血清および西洋わさびペルオキシダーゼでスパイクしたウシ血清は、最初にSELDIにより吸着剤表面に直接向けられた。上のふたつの微量タンパク質は、スパイク試料ではマーカーが検出され得ないことを示す。次いで、両試料は、サイズ排除スピノクロマトグラフィーにより、続いて強アニオン交換スピノクロマトグラフィーにより分別された。試料は、次いでSELDIにより吸着剤表面で観測された。この場合、マーカーは、スパイク試料では明白に検出され得るが、非スパイク試料では検出されない。

【図1】



【図2】

SELDI-Assisted™ タンパク質分別 および プロファイリング  
 HRPの検出(血清に添加)は、K30 および Q カラム 分別後のみ可能である。



フロントページの続き

(71)出願人 500164570  
 490 San Antonio Road,  
 Suite B, Palo Alto  
 o, CA 94306, United S  
 tates of America

(72)発明者 タン ティー. ファム  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94040,  
 マウンテン ビュー, リンカーン ド  
 ライブ 1101